

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANA BEATRIZ PAGNUSSAT

BACTÉRIAS ANAERÓBIAS EM HEMOCULTURAS: A EXPERIÊNCIA DE UM  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANA BEATRIZ PAGNUSSAT

BACTÉRIAS ANAERÓBIAS EM HEMOCULTURAS: A EXPERIÊNCIA DE UM  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laura Lúcia Cogo

Co-orientadora: Esp. Maristela de Paiva

CURITIBA

2013

## RESUMO

As bactérias anaeróbias fazem parte da microbiota normal de diversos órgãos e sistemas do corpo humano e são importantes patógenos relatados em casos de bacteremias, principalmente com o aumento do número de pacientes com doenças subjacentes complexas. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de bactérias anaeróbias em relação aos demais micro-organismos presentes nas infecções de corrente circulatória de pacientes internados no Hospital de clínicas da UFPR, na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil, durante o período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011. Para isolamento inicial foram utilizados frascos para hemocultura do sistema automatizado Bact-Alert (bioMérieux) e, depois de evidenciado crescimento, as amostras foram subcultivadas e identificadas de acordo com técnicas padronizadas. Dos 4778 episódios de infecção de corrente circulatória, foram isolados 5055 micro-organismos, sendo que em 260 episódios (5,4%) houve desenvolvimento de mais de um tipo microbiano. As bactérias anaeróbias representaram 1,03% (n=52) de todos os isolados encontrados, os fungos 2,06% (n=104), as micobactérias 0,12% (n=6) e as bactérias aeróbias 96,8% (n=4893). Em relação à idade dos pacientes, os micro-organismos anaeróbios ficaram distribuídos em pediátricos (3,8%), adultos (67,3%) e idosos (28,9%). A média de idade apresentada pelos pacientes foi de 51,6 anos, sendo a menor idade de 01 e a maior de 88 anos. Das 52 bactérias anaeróbias isoladas, 13,4% (n=7) pertenciam ao grupo *Bacteroides fragilis*, 7,7% (n=4) a outros Bacilos Gram negativos anaeróbios, 3,85% (n=2) foram identificados como *Clostridium* spp, 3,85% (n=2) *Peptostreptococcus* spp e 71,2% (n=37) faziam parte dos Bacilos Gram positivos anaeróbios não esporulados. Apesar da baixa ocorrência de bacteremia por anaeróbios, a identificação do agente etiológico é de extrema importância, uma vez que a mortalidade pode aumentar nos casos onde a terapia antimicrobiana é inadequada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias anaeróbias, Hemocultura, Bacteremia.

## 1 INTRODUÇÃO

As culturas de sangue representam um recurso fundamental no diagnóstico das infecções de corrente circulatória (7), as quais ocorrem pela entrada direta de micro-organismos na corrente sanguínea através de agulhas, catéteres e demais dispositivos intravasculares ou a partir de um foco de infecção à distância como exemplo, abscessos, aparelho geniturinário, trato respiratório, intestino e outros sítios (8).

Dependendo da interação entre o agente etiológico e a resposta imune do hospedeiro, através de vários eventos de ativação celular e mediadores inflamatórios do paciente contra as toxinas bacterianas, poderá implicar no desenvolvimento de sepse, uma complicação infecciosa de grande importância clínica (9).

Estudos relacionados à sepse no Brasil, mostram elevados índices de mortalidade, principalmente em pacientes críticos de unidades de terapia intensiva (5), em função do imunocomprometimento, idade, co-morbidades, uso de procedimentos invasivos, entre outros fatores de risco, relatando taxas de mortalidade decorrentes de infecções de corrente sanguínea que variam de 25 a 50% (6).

As bactérias anaeróbias fazem parte da microbiota normal de diversos órgãos e sistemas do corpo humano (11) e são importantes patógenos relatados em casos de bacteremias, principalmente com o aumento do número de pacientes com doenças subjacentes complexas (12).

A bacteremia por anaeróbios, apesar da baixa incidência, representa 0,5 a 9% de todas as hemoculturas positivas (13) e demonstra taxa de mortalidade que varia de 25 a 44%, podendo aumentar para 60% nos casos onde a terapia antimicrobiana é inadequada. Fato preocupante, visto que não há a suspeita inicialmente de infecção por anaeróbios e não se realiza uma cobertura antimicrobiana para este grupo de bactérias (14).

Por existirem poucos dados epidemiológicos relatados no Brasil, este trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência de bactérias anaeróbias no sangue de pacientes internados em um Hospital Universitário de grande porte localizado na região sul do país e determinar sua frequência em relação aos demais micro-organismos presentes nas infecções de corrente circulatória.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Pacientes**

Foi realizado um estudo sequencial retrospectivo de 4778 episódios de bacteremia de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UFPR durante o período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011. O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica da instituição com o registro CEP 2346.240/2010-10.

Para análise dos dados, os pacientes foram divididos de acordo com a faixa etária em: pediátricos (< 18 anos), adultos (entre 18 e 64 anos) e idosos ( $\geq 65$  anos).

## 2.2 Procedimentos microbiológicos

Em pacientes adultos e idosos o volume de sangue coletado foi de 5 a 10ml por frasco e para crianças, de 1 a 4ml, respeitando a relação peso/volemia. Em seguida o sangue foi inoculado diretamente em frasco próprio para hemocultura do sistema automatizado Bact/Alert® (bioMérieux, França), que contém TSB (Tryptic Soy Broth) como meio de crescimento e SPS (Polianetol Sulfonato de Sódio) como anticoagulante. Para micobactérias o volume de sangue inoculado foi o mesmo, porém, utilizado frasco específico (MB/Bact), contendo Middle brook Broth como meio de cultivo.

Os frascos foram incubados no equipamento à temperatura de 35-37° C sob agitação constante. O método de verificação de crescimento microbiano é baseado na formação de CO<sub>2</sub>, principal produto de degradação metabólica dos micro-organismos, detectado por um sensor colorimétrico no frasco e identificado pelo equipamento (3).

Evidenciado crescimento bacteriano, as amostras foram subcultivadas em ágar sangue infuso de cérebro e coração (BHI-S) suplementado com hemina (5 µg/mL) e menadiona (10 µg/mL) para recuperação de microrganismos anaeróbios, ágar chocolate para pesquisa de bactérias facultativas e fungos e ágar Lowenstein-Jensen para crescimento de micobactérias.

As placas e tubos foram, em seguida, incubados a uma temperatura de 35°C por um período de 24 a 48 horas para recuperação de bactérias anaeróbias facultativas, até cinco dias para anaeróbios e 60 dias para micobactérias. O ágar Lowenstein-Jensen foi incubado em atmosfera normal e o ágar chocolate em atmosfera com 5 a 10% de gás carbônico. O meio de cultivo para anaeróbios foi

incubado em jarra bacteriológica. A atmosfera de anaerobiose foi obtida pela introdução da mistura gasosa constituída de 80-85% de N<sub>2</sub>, 5-10% de CO<sub>2</sub> e 5-10% de H<sub>2</sub>, após duas lavagens prévias com nitrogênio, empregando paladium como catalisador da reação (2).

As culturas que apresentaram crescimento microbiano foram identificadas seguindo técnicas padronizadas (1,4,15) e classificadas em fungos, micobactérias, bactérias anaeróbias e bactérias aeróbias (grupo incluindo todas as bactérias que não as anaeróbias obrigatórias).

Os micro-organismos anaeróbios foram caracterizados em 5 grupos principais: grupo *Bacteroides fragilis*, *Clostridium* spp, *Peptostreptococcus* sp, Bacilos Gram positivos não esporulados (*Propionibacterium* spp), outros Bacilos Gram negativos anaeróbios (*Bacteroides* spp, *Prevotella* spp, *Porphyromonas* spp, *Fusobacterium* spp).

Em todos os frascos positivos foi realizada a coloração de Gram para verificação das características morfotintoriais bacterianas e controle dos procedimentos microbiológicos.

A ocorrência de múltiplos frascos positivos de hemocultura de um paciente com o mesmo agente etiológico foi considerada como um episódio de bacteremia.

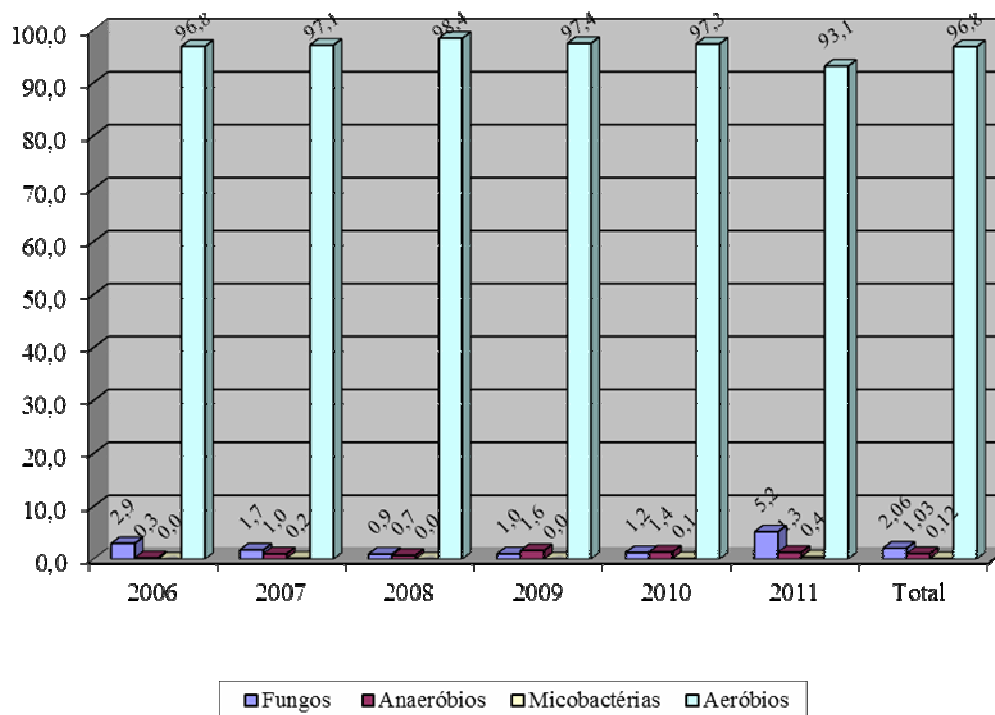
### **2.3 Análise estatística**

A análise dos dados foi feita por meio de metodologia estatística descritiva, utilizando o programa Excel como banco de dados dos resultados.

### 3 RESULTADOS

Dos 4778 episódios bacteremia, foram isolados 5055 micro-organismos, sendo que em 260 episódios (5,4%) houve desenvolvimento de mais de um tipo microbiano, incluindo bactérias anaeróbias, aeróbias e fungos. As bactérias anaeróbias representaram 1,03% (n=52) de todos os isolados encontrados, os fungos 2,06% (n=104), as micobactérias 0,12% (n=6) e as bactérias aeróbias 96,8% (n=4893). A Figura 1 representa a distribuição dos micro-organismos isolados nas hemoculturas, em relação aos diferentes anos estudados.

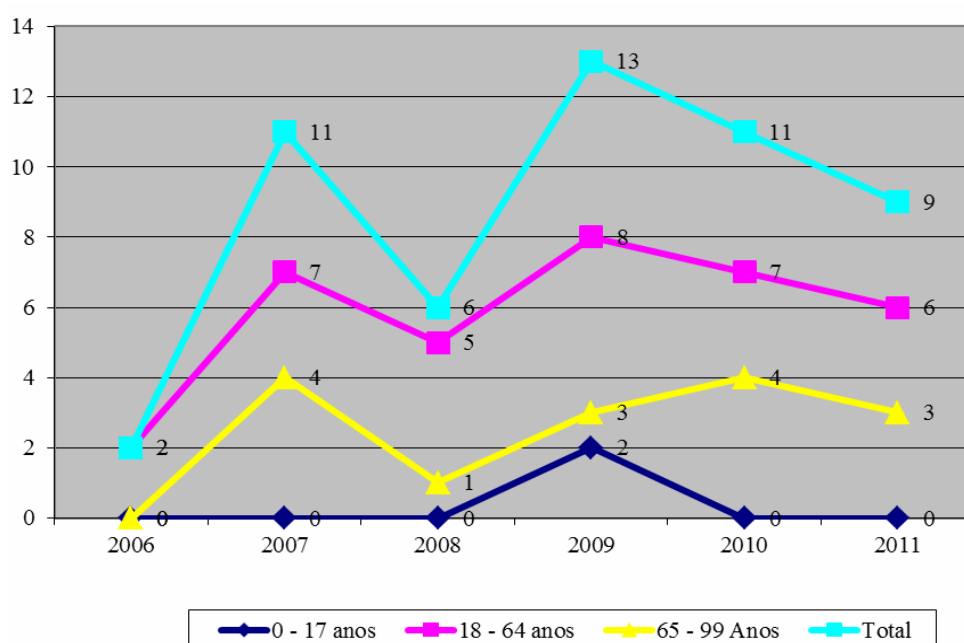
**FIGURA 1** – Porcentagem de micro-organismos isolados em hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UFPR no período de 2006 a 2011.





Em relação à presença de bactérias anaeróbias e a idade dos pacientes, os micro-organismos ficaram distribuídos, de acordo com a Figura a seguir, em pediátricos (3,8%), adultos (67,3%) e idosos (28,9%). A média de idade apresentada pelos pacientes foi de 51,6 anos, sendo a menor idade de 01 e a maior de 88 anos.

**FIGURA 2** – Número de bactérias anaeróbias isoladas em hemoculturas de acordo com a faixa etária, no período de 2006 a 2011.



Das 52 bactérias anaeróbias isoladas, 13,4% (n=7) pertenciam ao grupo *Bacteroides fragilis*, 7,7% (n=4) a outros Bacilos Gram negativos anaeróbios, 3,85% (n=2) foram identificados como *Clostridium* spp, 3,85% (n=2) *Peptostreptococcus* spp e 71,2% (n=37) faziam parte dos Bacilos Gram positivos anaeróbios não esporulados (*Propionibacterium* spp). A tabela abaixo contém os micro-organismos anaeróbios distribuídos entre os anos analisados.

**TABELA 1** – Distribuição das bactérias anaeróbias isoladas em hemoculturas durante o período de 2006 a 2011.

Bactérias Anaeróbias	Anos						Total (n=52)
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	-	2	-	2	2	1	7
Outros BGN anaeróbios	1	1	-	1	1	-	4
<i>Clostridium</i> spp	1	-	-	-	1	-	2
BGP anaeróbios não esporulados	-	8	5	9	7	8	37
<i>Peptostreptococcus</i> spp	-	-	1	1	-	-	2

Legenda: BGN (bacilos Gram negativos), BGP (bacilos Gram positivos).

#### 4 DISCUSSÃO

O exame de hemocultura é um dos testes mais importantes realizados no laboratório de microbiologia, pois através dele é possível a elucidação do agente etiológico da infecção. Na maioria dos casos avaliados neste trabalho houve o

desenvolvimento de apenas um micro-organismo. Porém, em 5,4% houve a presença de mais de um tipo microbiano, incluindo bactérias anaeróbias, aeróbias e fungos. Valores semelhantes foram apresentados por Silva, que relatou a presença de 4,6% de culturas mistas (10).

As bactérias anaeróbias são causas comuns de infecções de origem endógena e para sua identificação e isolamento são necessários métodos adequados de coleta e cultivo (21). Conforme apresentado na Figura 1, a porcentagem de bactérias anaeróbias encontradas foi inferior às bactérias aeróbias e aos fungos, porém superior às micobactérias. A taxa de isolamento dos anaeróbios nas hemoculturas variou de 0,3 a 1,6% nos diferentes anos estudados, representando 1,03% de todos os micro-organismos encontrados. Valores semelhantes foram encontrados por diferentes pesquisadores, oscilando de 0,6% a 3,3% (13,14,16,17,,22).

A maioria dos pacientes que apresentaram bactérias anaeróbias na corrente circulatória pertencia à faixa etária dos adultos (67,3%), seguido dos idosos (28,9%) e a idade média apresentada pelos pacientes foi de 51,6 anos. Estudos realizados por Bassa e colaboradores (14) e Blairon e colaboradores (22), demonstrou que idade média dos pacientes foi de 64,1 e 61,2 anos, respectivamente. Apesar das médias apresentadas serem superiores ao relatado nesse trabalho, a idade dos pacientes pertenciam à mesma faixa etária dos adultos, que inclui indivíduos entre 18 e 64 anos.

De acordo com a literatura, a bacteremia causada por anaeróbios em crianças é rara, confirmando os dados encontrados (3,8%). Outros trabalhos confirmam a baixa ocorrência nesse grupo etário (12).

Apesar de *Propionibacterium* spp ter sido o anaeróbio mais isolado neste trabalho, alguns autores não o incluem na análise dos dados (12,14) por ser

considerado como um contaminante em culturas de sangue (19,20), e apresentar baixo risco de mortalidade (18).

O segundo micro-organismo mais isolado foi o grupo *Bacteroides fragilis* (13,4%). Alguns autores o consideram como o patógeno anaeróbio predominante e de maior importância clínica em hemocultura (20,22).

Outros micro-organismos, como outros bacilos Gram negativos anaeróbios, foram isolados em menor quantidade, seguidos de *Clostridium* spp e *Peptostreptococcus* spp. Lassmann e colaboradores relatam que o grupo *Bacteroides fragilis*, *Clostridium* spp e *Peptostreptococcus* spp estão entre os anaeróbios mais frequentes isolados em hemocultura (12).

## **5 CONCLUSÃO**

Apesar da baixa ocorrência, a bacteremia anaeróbica permanece associada com mortalidade significativa (22) e realizar este diagnóstico em hemoculturas, principalmente em pacientes adultos e idosos internados pode ser relevante para uma antibioticoterapia adequada.

## **6 AGRADECIMENTOS**

Às Seções de Bacteriologia, Micologia e Gerência da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, por ter permitido a realização da pesquisa.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Uzeda, M. *Diagnóstico Bacteriológico de Infecções Anaeróbias*. (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1982. 82 p.
2. Sutter, V. L. *et al.* Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 4ed. Belmont Star Publishing. 1985
3. Vetter E, Torgerson C, Feuker A, Hughes J, Harmsen S, Schleck C, et al. *Comparison of the BACTEC MYCO/F Lytic bottle to the isolator tube, BACTEC Plus Aerobic F/bottle, and BACTEC Anaerobic Lytic/10 bottle and comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/bottle to the Isolator tube for recovery of bacteria, mycobacteria, and fungi from blood*. J Clin Microbiol. 39(12):4380-6, 2001.
4. Murray, P. R., E. J. Baron, *et al.* *Manual of Clinical Microbiology* 9ed. ASM Press, 2007.
5. Henkin CS *et al.* *Sepse: uma visão atual*. Scientia Medica, Porto Alegre, v.19, n.3, p. 135-145, 2009.
6. Porto, J.P. *Bacteremias associadas a cateteres venosos centrais: Etiologia, patogênese e fatores de risco em UTI de adultos de um Hospital Universitário*. [ Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia]. Universidade Federal de Uberlândia. 2008.
7. Alahmadi YM. *et al.* *Clinical and economic impact of contaminated blood cultures within the hospital setting*. J. Hosp. Infect, 77(3): 233-236, 2011.
8. Araujo, M.R.E. *Hemocultura: recomendações de coleta e processamento*. J. Infect. Control. ; 1(1):08-19, 2012.

9. Siqueira-Batista, Rodrigo et al. *Sepse: atualidades e perspectivas*. Rev. bras. ter. Intensiva vol.23 nº 2 São Paulo, 2011.
10. Silva, C.M.L. et al. *Incidência bacteriana em hemoculturas*. NewsLab ed.77p.132-134, 2006.
11. Ruiz-Giardim JM, Noguero Asensio. *A Bacteriemia por anaeróbios: características clínicoepidemiológicas de las bacteriemias por anaeróbios en dos períodos con una diferencia de 10 años*. An Med Interna (Madrid); 21:425-432, 2004.
12. Lassmann B. et al. *Reemergence of Anaerobic Bacteremia*. Cl. Infec. Dis;44:895-900, 2007.
13. J.-R. Zahar et al. *Incidence and clinical significance of anaerobic bacteraemia in cancer patients: a 6-year retrospective study*. Cl. Microbiol. And Infect.; v.11, n 9, 724-729, 2005.
14. Bassa A. et al. *Bacteremia por anaeróbios estrictos: estudio de 68 pacientes*. Enferm. Infecc Microbiol Clin. doi:10.1016, 2009.
15. Lacaz, C.S. et al. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: Sarvier, 2002.
16. Fenner, Lukas. et al. *Is the incidence of anaerobic bacteremia decreasing? Analysis of 114.000 blood cultures over a ten-year period*. J Clin Microbiol. : 46(7): 2432-2434, 2008.
17. Van der Poll T, Opal SM. *Host-pathogen interactions in sepsis*. Lancet Infect. Dis., 8:34-43, 2008.
18. Park, Hyun Jung. et al. *Clinical significance of Propionibacterium acnes recovered from blood cultures: analysis of 524 episodes*. J of Clin Microb. ;v.49 p. 1598-1601, 2011.

19. Justesen, U. S. et al. *16S rRNA gene sequencing in routine identification of Anaerobic bacteria isolated from blood cultures. J Clin Microbiol*, ; v.48, n.3, Mar, p.946-948, 2010.
20. Saito, T. et al. *Anaerobic Bacteremia: The yield of positive anaerobic blood cultures: patient characteristics and potential risk factors. Clin Chem.Lab.Med.* 41(3):293- 297, 2003.
21. Georgetown University School of Medicine. *The role of anaerobic bacteria in Bacteremia.* 16(3): 183-9. Epub 2009.Elsevier, 2010.
22. Blairon, L. et al. *A 62-month retrospective epidemiological survey of anaerobic Bacteraemia in a university hospital. Clinical Microbiol and Infect..* v.12, 527-532, 2006.